

Novas Estirpes de *Bradyrhizobium* para o Incremento da Produtividade de Genótipos de Soja em Terras Baixas



OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL

2

FOME ZERO
E AGRICULTURA
SUSTENTÁVEL



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Clima Temperado
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
330**

**Novas Estirpes de *Bradyrhizobium*
para Incremento da Produtividade de
Genótipos de Soja em Terras Baixas**

*Maria Laura Turino Mattos
Kassia Luiza Teixeira Cocco
Ana Claudia Barneche de Oliveira
Ricardo Alexandre Valgas
Walkyria Bueno Scivittaro
Mariangela Hungria*

Embrapa Clima Temperado
*Pelotas, RS
2019*

Embrapa Clima Temperado
BR 392 km 78 - Caixa Postal 403
CEP 96010-971, Pelotas, RS
Fone: (53) 3275-8100
www.embrapa.br/clima-temperado
www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê Local de Publicações

Presidente

Luis Antônio Suíta de Castro

Vice-Presidente

Ana Cristina Richter Krolow

Secretário-Executivo

Bárbara Chevallier Cosenza

Membros

*Ana Luiza B. Viegas, Fernando Jackson,
Marilaine Schaun Pelufê, Sonia Desimon*

Revisão de texto

Bárbara Chevallier Cosenza

Normalização bibliográfica

Marilaine Schaun Pelufê

Editoração eletrônica

Fernando Jackson

Foto da capa

Maria Laura Turino Mattos

1ª edição

Obra digitalizada (2019)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Clima Temperado

N936 Novas estirpes de *Bradyrhizobium* para o incremento da
produtividade de genótipos de soja em terras baixas /
Maria Laura Turino Mattos... [et al.]. – Pelotas:
Embrapa Clima Temperado, 2019.
15 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento /
Embrapa Clima Temperado, ISSN 1678-2518 ; 330)

1. Soja. 2. Rhizobium. 3. Inoculação. 4. Fixação de
nitrogênio. I. Mattos, Maria Laura Turino. II. Série.

CDD 634.425

Sumário

Introdução.....	7
Material e Métodos	7
Resultados e Discussão	9
Conclusões.....	14
Agradecimentos.....	14
Referências	15

Novas Estirpes de *Bradyrhizobium* para Incremento da Produtividade de Genótipos de Soja em Terras Baixas

Maria Laura Turino Mattos¹

Kassia Luiza Teixeira Cocco²

Ana Claudia Barneche de Oliveira³

Ricardo Alexandre Valgas⁴

Walkyria Bueno Scivittaro⁵

Mariangela Hungria⁶

Resumo - Entre os fatores limitantes para o cultivo de soja em terras baixas, destaca-se a drenagem natural deficiente dos solos, ocasionada pelo relevo predominantemente plano e pela ocorrência de frequentes períodos de estiagem, provocando alternância entre excesso e déficit de umidade do solo. Em vista disso, distintas respostas podem ser obtidas da interação entre genótipos de soja adaptados a esse ambiente e estirpes de rizóbios efetivas na fixação biológica de nitrogênio (FBN). O presente trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência simbiótica de novas estirpes de *Bradyrhizobium* para o incremento da produtividade de duas linhagens de soja (PELBR10-6000 e PELBR10-6049) em terras baixas. O experimento foi conduzido em campo na safra agrícola 2017/2018, na Estação Experimental Terras Baixas da Embrapa Clima Temperado, Capão do Leão, RS, sob Planossolo Háplico. Os tratamentos consistiram na aplicação dos inoculantes com as estirpes CMM 373, CMM 375, CMM 381, CMM 382, CMM 383, CMM 384, CMM 385 e CMM 387, todos obtidos a partir de isolamentos de nódulos de soja em terras baixas e identificados como *Bradyrhizobium elkanii*, além de dois inoculantes comerciais com as estirpes SEMIA 5079 + SEMIA 5080, um controle absoluto sem inoculação e sem N, e outro sem inoculação, mas recebendo 200 kg ha⁻¹ de N mineral. Foi avaliado, aos 35 dias pós-emergência, o número de nódulos, massa de nódulos secos, massa da parte aérea seca das plantas de soja, teor de N total acumulado na parte aérea e, na maturidade fisiológica, rendimento de grãos. Pode-se concluir que ambas as linhagens de soja PELBR10-6000 RR e PELBR10-6049 RR expressam elevadas produções de grãos com novas estirpes de *Bradyrhizobium elkanii*, decorrentes da eficiência do processo de FBN; e que estirpes de *B. elkanii* CMM 382, CMM 383, CMM 384 e CMM 385 apresentam desempenho superior com PELBR10-6000 RR e PELBR10-6049 RR, no processo de FBN nas terras baixas. Essas estirpes *Bradyrhizobium elkanii* têm potencial biotecnológico para a inoculação de linhagens de soja tolerantes à condição de drenagem natural deficiente dos solos hidromórficos do Rio Grande do Sul.

Termos para indexação: fixação biológica de nitrogênio, solo, drenagem natural deficiente

¹ Engenheira-agrônoma, doutora em Ciência do Solo, pesquisadora da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

² Engenheira-agrônoma, doutora em Fisiologia Vegetal, bolsista Capes de pós-doutorado, Pelotas, RS.

³ Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

⁴ Estatístico, mestre em Métodos Numéricos em Engenharia, pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

⁵ Engenheira-agrônoma, doutora em Ciências, pesquisadora da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

⁶ Engenheira-agrônoma, doutora em Ciência do Solo, pesquisadora da Embrapa Soja, Londrina, PR.

New *Bradyrhizobium* Strains to Increased Productivity of Soybean Genotypes in Lowlands

Abstract - Among the limiting factors for lowland soybean cultivation, we highlight the poor natural drainage of the soil, caused by the predominantly flat relief and by the occurrence of frequent drought periods, causing alternation between excess and deficit of moisture in soil. Therefore, different responses can be obtained from the interaction between soybean genotypes adapted to this environment and rhizobia strains effective in biological nitrogen fixation (BNF). The present work aimed to evaluate the symbiotic efficiency of new *Bradyrhizobium* strains to increase the productivity of two soybean strains (PELBR10-6000 and PELBR10-6049) in lowlands. The experiment was carried out in the field during the 2017/2018 agricultural season, at Lowlands Experimental Station, Embrapa Temperate Agriculture, Capão do Leão, RS. The treatments consisted of the inoculants application with the accessions CMM 373, CMM 375, CMM 381, CMM 382, CMM 383, CMM 384, CMM 385 and CMM 387 of two commercial inoculants with SEMIA 5079 + SEMIA 5080 strains, an absolute control and another control without inoculation but with the application of 200 kg ha⁻¹ of mineral N. Number of nodules, nodule and shoot dry mass of soybean plants, total N in dry mass and mature leaves were evaluated. It can be concluded that both soybean strains PELBR10-6000 RR and PELBR10-6049 RR express high grain yield with new *Bradyrhizobium elkanii* strains, resulting from the efficiency of the FBN process; whereas strains of *B. elkanii* CMM 382, CMM 383, CMM 384 and CMM 385 have superior performance with PELBR10-6000 RR and PELBR10-6049 RR in the lowland FBN process. These *Bradyrhizobium elkanii* strains have biotechnological potential for the inoculation of soybean lines tolerant to the deficient natural drainage condition of hydromorphic soils from Rio Grande Sul State.

Index terms: biological nitrogen fixation, soil, poor natural drainage.

Introdução

No Estado do Rio Grande do Sul (RS) cultiva-se arroz (*Oryza sativa* L.) irrigado por inundação em agroecossistemas de terras baixas (TB), ocupando área aproximada de 1 milhão de ha (IRGA, 2019). A produtividade média alcançada é superior a 7,5 t ha⁻¹, fruto da tecnificação da lavoura, das condições ambientais e da experiência dos orizicultores. A rotação de culturas ao arroz é prática recomendada pela pesquisa em terras baixas (TB), sendo a soja [*Glycine max* (L.) Merr.] uma das espécies alternativas utilizadas no verão, permitindo a diversificação do sistema de produção para o atendimento de aspectos econômicos e técnicos. Nos últimos anos, tem sido expressiva a expansão da soja na Metade Sul do RS e, na safra 2017/2018, a área de soja em rotação com arroz alcançou cerca de 300 mil ha (IRGA, 2019).

Entre os fatores limitantes para o cultivo de soja em TB, destaca-se a drenagem natural deficiente (hidromorfismo) dos solos, ocasionada pelo relevo predominantemente plano e pela ocorrência de frequentes períodos de estiagem, provocando alternância entre o excesso e o déficit de umidade do solo.

A influência da disponibilidade hídrica na qualidade comercial de grãos de linhagens de soja em TB foi avaliada por Cocco et al. (2018). Os autores constataram que, na safra 2017/2018, a disponibilidade hídrica insuficiente (3,78 mm dia⁻¹) durante a fase reprodutiva da soja exerceu efeito sobre a qualidade de grãos das linhagens PELBR10-6000 e PELBR10-6049. A maior porcentagem de grãos normais e a menor incidência de grãos avariados foram obtidas quando PELBR10-6000 foi inoculada com os acessos diazotróficos CMM 381 e CMM 382, enquanto que, para PELBR10-6049, isso foi possível com os acessos CMM 375, CMM 382, CMM 383 e CMM 387.

Cultivares melhoradas portadoras de genes capazes de expressar alta produtividade, ampla adaptação e boa resistência/tolerância a fatores bióticos e abióticos representam contribuição significativa à eficiência do setor produtivo de soja, principalmente nas áreas onde há deficiência de drenagem natural do solo, decorrente do relevo predominantemente plano e ocorrência de frequentes períodos de estiagem, provocando alternância entre excesso e déficit hídrico (Oliveira, 2017). Em vista disso, distintas respostas podem ser obtidas da interação entre genótipos de soja adaptados a esse ambiente e estirpes de rizóbios efetivas na fixação biológica de nitrogênio (FBN).

Genótipos de soja têm sido avaliados quanto à tolerância ou sensibilidade ao encharcamento, e quanto à interação com estirpes efetivas para FBN em TB (Mattos; Oliveira, 2014), destacando-se as cultivares BRS 154, CD 213, BRS 211, Fundacep 56 RR e BRS 255 RR, que apresentam maior sensibilidade ao excesso de água, e as linhagens PELBR10-6063, PELBR10-6072 e PELBR10-6005, classificadas entre as mais produtivas para uso em rotação com o arroz irrigado em solos hidromórficos (Verneti Junior et al., 2012; Rosa et al., 2013).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência agrônômica de novas estirpes de *Bradyrhizobium* para a promoção da produtividade de genótipos de soja em terras baixas.

Material e Métodos

Caracterização dos isolados

Foram utilizadas oito estirpes diazotróficas depositadas na Coleção de Microrganismos Multifuncionais de Clima Temperado (CMMCT), que foram isoladas de nódulos de plantas de soja cultivadas nas terras baixas. As estirpes foram caracterizadas por meio de testes morfológicos e fisiológicos (no prelo)⁷. Para a identificação taxonômica e do perfil de DNA, as bactérias foram submetidas à amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA e à análise por BOX-PCR, conforme descrito por Delamuta et al. (2016).

⁷ MATTOS, M. L. T.; OLIVEIRA, A. C. B. de **Fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja. Parte I:** Prospecção de rizóbios para soja cultivada em solos com deficiência de drenagem natural no bioma Pampa. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2019. (Embrapa Clima Temperado. Documentos). No prelo.

Avaliação da eficiência agronômica

O experimento foi conduzido sob condições de campo na safra agrícola 2017/2018, na Estação Experimental Terras Baixas da Embrapa Clima Temperado, no município de Capão do Leão, RS, em solo classificado como Planossolo Háptico, com as seguintes características químicas: pH(água): 6,2; 0,9% de M.O.; 5,7 mg dm⁻³ de P; 57 mg dm⁻³ de Na; 179 mg dm⁻³ de K; 2,2 cmol_c dm⁻³ de Ca; 1,4 cmol_c dm⁻³ de Mg, saturação por bases de 64%; e CTC pH_{7,0}: 6,8 cmol_c dm⁻³. Anteriormente à instalação dos experimentos, procedeu-se à adubação básica de semeadura com 400 kg ha⁻¹ da formulação 0-25-25. Foram utilizadas sementes de duas linhagens de soja tolerantes ao encharcamento, PELBR10-6000 RR (L1) e PELBR10-6049 RR (L2), oriundas do programa de melhoramento genético da Embrapa.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com quatro repetições. A avaliação da eficiência agronômica foi realizada conforme o protocolo da Instrução Normativa nº 13, de 03/2011, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa). A semeadura, em cultivo convencional, foi realizada em 01/12/2017, em parcelas experimentais de 4,0 m x 5,0 m (20 m²), equidistantes em 4,0 m, com oito linhas espaçadas de 0,5 m. A irrigação por aspersão, durante todo o ciclo da cultura, foi realizada quando a tensão de água no solo atingiu 40 kPa. Os tratamentos foram constituídos conforme a seguir:

- (1) semeadura sem aplicação de fertilizante nitrogenado e sem inoculação (testemunha)
- (2) 100% N mineral [200 kg de N ha⁻¹, sendo 50% no plantio e 50% na floração, tendo como fonte a ureia], sem inoculação
- (3) inoculante turfoso composto de substrato ultrafino contendo as estirpes SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*) + SEMIA 5080 (*B. diazoefficiens*) em elevada concentração (5,5 x 10⁹ UFC g⁻¹) + solução de açúcar 10% (Inoculante A)
- (4) inoculante turfoso micronizado de extrema finura contendo as estirpes SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*) + SEMIA 5080 (*B. diazoefficiens*) em elevada concentração (5 x 10⁹ UFC g⁻¹) + aditivo composto por complexo de açúcares, agentes antioxidantes e biopolímeros osmoprotetores (Inoculante B)
- (5) Estirpe CMM 373 em formulação turfosa + aditivo para inoculante composto de açúcares e biopolímeros encapsulados
- (6) Estirpe CMM 375 em formulação turfosa + aditivo para inoculante composto de açúcares e biopolímeros encapsulados
- (7) Estirpe CMM 381 em formulação turfosa + aditivo para inoculante composto de açúcares e biopolímeros encapsulados
- (8) Estirpe CMM 382 em formulação turfosa + aditivo para inoculante composto de açúcares e biopolímeros encapsulados
- (9) Estirpe CMM 383 em formulação turfosa + aditivo para inoculante composto de açúcares e biopolímeros encapsulados
- (10) Estirpe CMM 384 em formulação turfosa + aditivo para inoculante composto de açúcares e biopolímeros encapsulados
- (11) Estirpe CMM 385 em formulação turfosa + aditivo para inoculante composto de açúcares e biopolímeros encapsulados
- (12) Estirpe CMM 387 em formulação turfosa + aditivo para inoculante composto de açúcares e biopolímeros encapsulados

Os inoculantes comerciais, formulações turfosas, contendo as estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 + SEMIA 5080, foram fornecidos pela empresa Total Biotecnologia, Curitiba, PR. No processo de inoculação das sementes, utilizaram-se:

- 80 g de inoculante por 50 kg de sementes de soja (concentração de 5,5 x 10⁹ UFC mL⁻¹), de forma a propiciar a concentração de 10⁶ células por semente inoculada + 300 mL de solução açucarada 10% (Inoculante A)
- 200 g de inoculante por 50 kg de sementes de soja, de forma a propiciar a concentração de 10⁶ células por semente inoculada + 150 mL de aditivo microbiano (Inoculante B)

As estirpes foram crescidas em caldo 79 YM (*yeast-manitol*) até a concentração 10⁸ - 10⁹ UFC mL⁻¹, estimada pela contagem de colônias em placas contendo meio 79 YM (Hungria; Araujo, 1994), sendo, posteriormente, inoculadas em matriz turfosa (esterilizada por raios gama) na dose de 15 mL do inóculo adicionado a

35 g de turfa, que foi incubada a 28 °C por sete dias. Após, utilizou-se a proporção de 1.000 g de sementes misturadas em 10 g de inoculante, sendo colocadas para secar em temperatura ambiente de laboratório (22 °C), por 30 minutos.

Na pré-semeadura da soja, foi determinada a população de rizóbios do solo, coletando-se amostras em quintuplicata, na profundidade de 0-10 cm. Foi empregado o método de diluição e contagem em placas do número de células de rizóbio (método espalhamento), utilizando-se o meio de extrato de levedura-manitol 79 + vermelho congo e temperatura de incubação de 28 °C (Hungria; Araújo, 1994).

A nodulação foi avaliada no estágio de desenvolvimento vegetativo da soja, 35 dias pós-emergência (DPE). Cinco plantas foram coletadas com as raízes intactas, na terceira linha de cada lado da parcela, totalizando dez plantas. Após, separou-se a parte aérea das raízes e, sob peneira e água corrente, os nódulos das raízes foram destacados, lavados e contados. Posteriormente, amostras da parte aérea (colmos + folhas) e dos nódulos foram colocados em estufa (60 °C) até atingirem massas constantes, quando foram pesados. Determinou-se o número e a massa de nódulos secos (MNS), a massa da parte aérea seca (MPAS), e o teor de N na MPAS (folhas + colmo).

O teor de N foi determinado também em amostras constituídas das terceiras folhas maduras do terço superior da haste principal, no florescimento pleno da soja (estádio R₂) (Sociedade..., 2016). Para tanto, foram coletadas 30 folhas nas quatro linhas centrais de 3,0 m de comprimento de cada parcela experimental.

Na sequência, amostras dessas matrizes (colmos + folhas e folhas maduras) foram moídas e submetidas às análises por espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) para determinação do N na parte aérea e tecido foliar.

A produtividade de grãos, com 13% de umidade, foi determinada em área útil de parcela de 6 m², constituída de quatro linhas centrais de plantas com 5 m de comprimento.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e, quando significativos pelo teste F, procedeu-se à comparação de médias pelos testes de Scott-Knott (p< 0,05) e Tukey (p<0,05).

Resultados e Discussão

Identificação dos acessos

No sequenciamento do gene 16S rRNA, todos os isolados obtidos em terras baixas foram identificados como pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, apresentando maior similaridade com a espécie *B. elkanii* (dados não mostrados). Na análise de similaridade genética de oito acessos CMM com as estirpes padrões de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079), *B. diazoefficiens* (SEMIA 5080) e *B. elkanii* (587 e 5019), que são as quatro estirpes autorizadas para o uso na fabricação de inoculantes comerciais no Brasil, constatou-se que todos os isolados apresentaram perfis semelhantes aos de *B. elkanii* estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019. A única exceção foi CMM 381, que apresentou perfil distinto das quatro estirpes comerciais e pode representar um isolado nativo da região.

Em solos de terras baixas, com drenagem natural deficiente (hidromorfismo), plantas de soja podem estar submetidas a hipoxia (baixa concentração de oxigênio), ocorrendo alterações hormonais, como o aumento da produção endógena de etileno, o que pode prejudicar a nodulação (James; Crawford, 1998; Oldroyd et al., 2001). A inibição da nodulação por etileno, contudo, pode ser compensada pela produção de rizobiotoxina por *Bradyrhizobium elkanii* (Duodu et al., 1999). Segundo Scholles e Vargas (2004), tal mecanismo de limitação da produção de etileno não é conhecido em outras espécies de rizóbio. Dessa forma, plantas de soja inoculadas com estirpes de *B. japonicum* poderiam ter sua nodulação mais afetada pela inundação do solo do que as inoculadas com estirpes de *B. elkanii*. Essas observações corroboram a identificação dos acessos como *B. elkanii*, os quais promoveram os melhores benefícios para a produtividade das linhagens de soja tolerantes ao encharcamento do solo (dados obtidos neste trabalho).

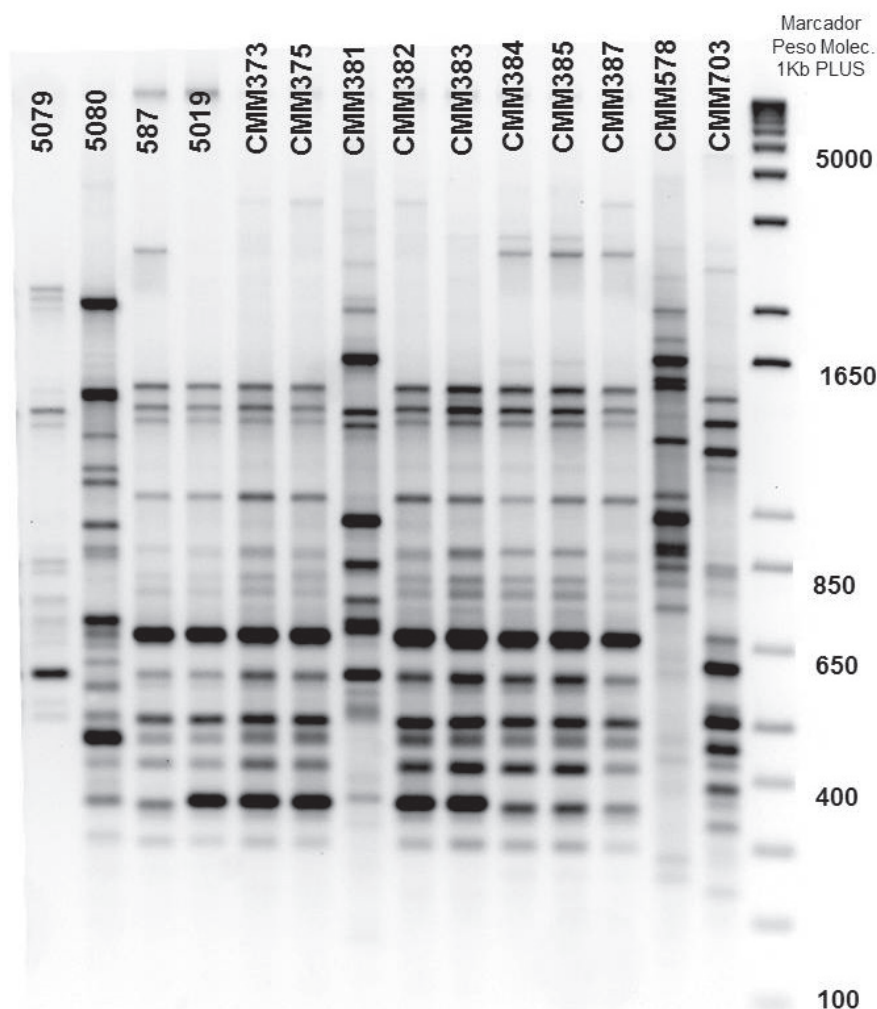


Figura 1. Gel de agarose contendo fragmentos de DNA após a amplificação por BOX-PCR de 12 estirpes, sendo 8 estirpes CMM (373, 375, 381, 382, 383, 384, 385, 387) e as 4 estirpes autorizadas para a fabricação de inoculantes comerciais no Brasil [*Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 + 5080); *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587 + SEMIA 5019)]. Pelotas, RS. 2019.

População de rizóbios

A população estabelecida de rizóbios na área experimental foi expressiva para solos de terras baixas, com concentração de $4,1 \times 10^5$ bactérias g^{-1} solo. Em solos hidromórficos, concentrações elevadas de população estabelecida de rizóbios de 10^6 bactérias g^{-1} solo foram relatadas por Maldaner et al. (2015); Mattos e Oliveira (2014). Essa população de rizóbios, que resulta de inoculações realizadas em anos anteriores e que apresenta persistência elevada (Campos et al., 2001), pode formar nódulos e fixar N_2 , principalmente durante a formação secundária de nódulos após o florescimento, contribuindo, substancialmente, para o fornecimento de N para a planta. Além disso, o conhecimento da dinâmica da população de rizóbios no solo permite delinear estratégias para aumentar a competitividade da estirpe inoculante frente à população estabelecida (Zilli et al., 2013).

Nodulação da soja

Os valores de número e massa de nódulos secos (MNS) da soja estão apresentados na Tabela 1. Aos 35 DPE, os tratamentos diferiram significativamente quanto ao número de nódulos para as duas linhagens.

Na interação dos tratamentos com as linhagens, constatou-se que as plantas da linhagem PELBR10-6000 RR que apresentaram mais de 30 nódulos foram inoculadas com os produtos comerciais, com as estirpes CMM 383, 384, além dos inoculantes A e B, não inoculadas e sem nitrogênio, enquanto que plantas da linha-

gem PELBR10-6049 RR que apresentaram mais de 30 nódulos foram inoculadas com as estirpes CMM 375, CMM 382, CMM 383 e CMM 387 (Tabela 1). Os demais tratamentos de ambas as linhagens apresentaram formação média de nódulos superior a 20 planta⁻¹, com exceção somente do tratamento com a estirpe CMM 382 e a linhagem PELBR10-6000 RR, que resultou em número inferior 20 (Tabela 1). Porém, essa nodulação das linhagens mostrou-se adequada, uma vez que um número de nódulos entre 15 e 30, nesse estágio de avaliação, seria suficiente para garantir o fornecimento de N requerido por uma planta de soja para seu desenvolvimento normal (Hungria et al., 2007).

Na interação das linhagens com os tratamentos, verificou-se que a linhagem PELBR10-6049 RR apresentou o maior número de nódulos planta⁻¹, superando PELBR10-6000 RR com as estirpes CMM 373, CMM 375, CMM 382, CMM 383, CMM 385 e CMM 387. Quando avaliadas as linhagens no tratamento com nitrogênio, não houve diferença significativa, indicando efeito semelhante no número de nódulos planta⁻¹. Por outro lado, comparando-se as linhagens no tratamento com omissão de nitrogênio e sem inoculante, a linhagem PELBR10-6000 RR foi superior para essa variável (Tabela 1), mostrando potencial para interagir com os rizóbios estabelecidos no solo hidromórfico.

Quanto à variável MNS, a linhagem PELBR10-6000 RR com o inoculante composto de suporte turfoso micronizado (B) apresentou o maior valor de MNS (134,2 mg planta⁻¹). Bom desempenho quanto à MNS, diferindo estatisticamente do inoculante (B), foi constatado nessa linhagem com os tratamentos inoculante turfoso composto de substrato ultrafino (A), CMM 381, CMM 383, CMM 384, CM e CMM 387. O grupo inferior foi composto pelos valores de MSN dos tratamentos do controle absoluto e as estirpes CMM 373, CMM 375, CMM 382 e CMM 385. O maior valor de MNS entre as estirpes foi constatado com CMM 387.

Para a linhagem PELBR10-6049, novamente o inoculante (B) destacou-se, bem como a estirpe CMM 375 nos valores superiores de MNS, 128,6 mg e 131,3 mg planta⁻¹, respectivamente. Todos os demais tratamentos apresentaram bom desempenho, exceto o inoculante (A), que diferiu significativamente.

Os maiores valores de MNS observados na linhagem PELBR10-6049, em média 108,6 mg planta⁻¹, em comparação com 91,5 mg planta⁻¹, representam indicativo de maior tolerância aos estresses provocados pelo excesso hídrico.

Tabela 1. Número e massa de nódulos secos de duas linhagens de soja, em função da inoculação com novas estirpes de rizóbios. Médias de quatro repetições. Safra 2017/2018. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2019.

Tratamentos	Número (n° planta ⁻¹)		Massa (mg planta ⁻¹)	
	Linhagem 1 [*] Médias	Linhagem 2 ^{**} Médias	Linhagem 1 Médias	Linhagem 2 Médias
Controle absoluto	33 ab	27 d	89,3 abc	114,1 ab
100% N	28 de	26 d	71,9 bc	84,1 ab
Inoculante A ^{***}	31 abc	24 e	114,5 ab	75,4 b
Inoculante B ^{****}	34 a	26 d	134,2 a	128,6 a
Estirpe CMM 373	22 g	29 bc	69,4 bc	118,2 ab
Estirpe CMM 375	23 fg	31 b	69,6 bc	131,3 a
Estirpe CMM 381	27 de	23 e	97,0 ab	99,7 ab
Estirpe CMM 382	16 h	36 a	42,6 c	117,0 ab
Estirpe CMM 383	31 bc	31 b	109,5 ab	118,2 ab
Estirpe CMM 384	30 cd	26 d	98,3 ab	96,4 ab
Estirpe CMM 385	26 ef	27 cd	89,7 abc	107,9 ab
Estirpe CMM 387	28 de	31 b	111,8 ab	112,4 ab
CV (%)<30				

* PELBR10-6000 RR ** PELBR10-6049 RR *** Inoculante turfoso (substrato ultrafino) estirpes SEMIA 5079 + SEMIA 5080; **** Inoculante turfoso (substrato micronizado) estirpes SEMIA 5079 + SEMIA 5080

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Teores de N na parte aérea e folhas maduras

O N nos tecidos foliares foi avaliado nos principais tratamentos, sendo semelhantes para ambas as linhagens, não ocorrendo diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 1). O N fertilizante mineral e as estirpes componentes dos inoculantes comerciais proporcionaram o mesmo acúmulo de N no tecido foliar, não diferindo, ainda, do tratamento com omissão de nitrogênio. Nesse sentido, destaca-se que as estirpes CMM avaliadas contribuíram para absorção do nitrogênio necessário para a promoção da produtividade da soja (Tabela 4). Além disso, somente a interação da linhagem PELBR10-6049 RR com as estirpes do inoculante turfoso (substrato micronizado) apresentou teor foliar de N dentro da faixa de suficiência para a cultura (4,5% – 5,5%) (Sociedade..., 2016).

Quanto ao nitrogênio acumulado na massa seca da parte aérea (colmos + folhas), houve diferença significativa entre os tratamentos para a linhagem PELBR10-6000 RR com o inoculante (A), superior estatisticamente ao controle não inoculado e sem fertilizante. Todos os demais tratamentos inoculados não diferiram estatisticamente desse tratamento (100% N), apresentando bom desempenho. Para PELBR10-6049 RR, não houve diferença significativa entre os tratamentos selecionados. Além disso, nenhum dos tratamentos apresentou teores foliares de N dentro da faixa de suficiência para a cultura (4,5% – 5,5%) (Sociedade..., 2016).

Tabela 2. Teor de nitrogênio na folha madura da soja e acumulado na massa da parte aérea seca (N MPAS), em função dos tratamentos. Safra 2017/2018. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2019.

Tratamentos	N foliar		N MPAS	
	----- (%) -----		-----	
	Linhagem 1* Médias	Linhagem 2** Médias	Linhagem 1 Médias	Linhagem 2 Médias
Controle absoluto	3,98 a	4,13 a	3,24 b	3,60 a
100% N	4,33 a	4,30 a	3,66 ab	3,59 a
Inoculante A***	4,01 a	3,91 a	4,15 a	3,55 a
Inoculante B****	4,20 a	4,84 a	3,44 ab	3,62 a
Estirpe CMM 375	3,97 a	3,78 a		3,55 a
Estirpe CMM 381			3,73 ab	
Estirpe CMM 382	3,70 a	3,87 a	3,77 ab	3,56 a
Estirpe CMM 383	3,80 a	3,46 a	4,03 ab	3,55 a
Estirpe CMM 384		3,67 a		3,36 a
Estirpe CMM 385		3,74 a		3,27 a
Estirpe CMM 387		3,73 a		3,45 a

* PELBR10-6000 RR ** PELBR10-6049 RR *** Inoculante turfoso (substrato ultrafino) estirpes SEMIA 5079 + SEMIA 5080; **** Inoculante turfoso (substrato micronizado) estirpes SEMIA 5079 + SEMIA 5080

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Produção da massa da parte aérea seca

Quanto à variável produção de matéria seca da parte aérea das linhagens de soja, houve diferença significativa da interação entre a linhagem e a estirpe somente para PELBR10-6049 RR (Tabela 3). Na presença de N fertilizante mineral, houve a maior produção de MPAS, mas que não diferiu estatisticamente da maioria dos tratamentos, exceto pela inoculação com as estirpes CMM 383, CMM 384 e CMM 387.

Tabela 3. Produção da massa da parte aérea seca de linhagens de soja, em função dos tratamentos. Safra 2017/2018. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2019.

Tratamentos	MPAS (g planta ⁻¹)	
	Linhagem 1 Médias	Linhagem 2 Médias
Controle absoluto	3,69 a	4,68 abc
100% N	4,13 a	6,02 a
Inoculante A	4,20 a	4,86 abc
Inoculante B	3,78 a	5,40 abc
Estirpe CMM 373	4,61 a	4,82 abc
Estirpe CMM 375	4,18 a	5,76 ab
Estirpe CMM 381	4,15 a	4,69 abc
Estirpe CMM 382	3,34 a	5,17 abc
Estirpe CMM 383	4,08 a	4,49 bc
Estirpe CMM 384	4,07 a	4,20 c
Estirpe CMM 385	3,59 a	4,84 abc
Estirpe CMM 387	3,63 a	4,23 c

* PELBR10-6000 RR ** PELBR10-6049 RR *** Inoculante turfoso (substrato ultrafino) estirpes SEMIA 5079 + SEMIA 5080; **** Inoculante turfoso (substrato micronizado) estirpes SEMIA 5079 + SEMIA 5080

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Produtividade de grãos

As linhagens apresentaram comportamentos diferentes quanto à variável produtividade de grãos, verificando-se significância das estirpes dentro de cada linhagem (Tabela 4).

Para a linhagem PELBR10-6000 RR, houve formação de três agrupamentos, sendo que a estirpe CMM 383 proporcionou a maior produtividade de grãos (5.197 kg h⁻¹), o que representa incremento de 18% na produtividade em relação ao uso da adubação nitrogenada de base e em cobertura, e 21% superior ao controle absoluto, demonstrando o potencial dessa estirpe para a FBN em terras baixas (Tabela 4). O segundo grupo foi observado pela inoculação com a estirpe CMM 382 e pelos controles não inoculados, com e sem N fertilizante. No caso do controle absoluto, os resultados confirmam o bom desempenho da população naturalizada de rizóbios. Todos os demais tratamentos apresentaram desempenho estatisticamente inferior

Para a linhagem PELBR10-6049 RR, formaram-se dois agrupamentos, sendo o agrupamento com maior produtividade de grãos composto pelos seguintes tratamentos: inoculante composto de substrato micronizado (B), 100% de N fertilizante mineral e estirpes CMM 385 CMM e CMM 384, todos com rendimentos superiores a 7 mil kg ha⁻¹. Essas estirpes (CMM 382, CMM 384 e CMM 385) garantiram um incremento na produtividade de 19% (123 sacos ha⁻¹), em relação às plantas do controle absoluto (sem inoculante e omissão de fertilização nitrogenada), que, em função da elevada população de rizóbios compatíveis e das reservas de N do solo, foram supridas com N e produziram 103 sacos ha⁻¹. Esses resultados de produtividade corroboram com Mattos e Oliveira (2014), que verificaram a efetividade de estirpes de *Bradyrhizobium* na nodulação da soja, cultivar BRS 246, cultivada em terras baixas. Os autores constataram a sobrevivência das estirpes SEMIA 5080 (*B. diazoefficiens*) e 5019 (*B. elkanii*) sob condições de saturação do solo e estresses por excessos hídricos e térmicos.

Em trabalho realizado em campo com a cultivar de soja NA 5909 RG, sob condição de excesso hídrico, Mattos et al. (2015) verificaram a nodulação efetividade das estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079) e *B. diazoefficiens* (SEMIA 5080), com dois dias de pré-tratamento das sementes com inoculante líquido e aditivos protetores bacterianos, que promoveram incremento de 20% (54 sacos ha⁻¹) sobre o rendimento, comparativamente à testemunha não inoculada e sem nitrogênio. Assim, constata-se o potencial das linhagens e dos acessos avaliados neste trabalho para produtividade elevada nas condições de terras baixas.

Tabela 4. Produção de grãos (kg ha⁻¹) de dois genótipos de soja, em função da inoculação com novas estirpes de rizóbios. Médias de quatro repetições. Safra 2017/2018. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2019.

Tratamentos	Linhagens	
	PELBR10-6000 RR Médias	PELBR10-6049 RR Médias
Controle absoluto	4.295 b	6.208 b
100% fertilização química	4.392 b	7.714 a
Inoculante com substrato micronizado	3.944 c	7.738 a
Inoculante com substrato ultrafino	3.639 c	6.414 b
Estirpe CMM 373	3.789 c	6.885 b
Estirpe CMM 375	3.402 c	6.714 b
Estirpe CMM 381	3.577 c	6.847 b
Estirpe CMM 382	4.215 b	7.393 a
Estirpe CMM 383	5.197 a	6.652 b
Estirpe CMM 384	3.765 c	7.365 a
Estirpe CMM 385	3.577 c	7.400 a
Estirpe CMM 387	3.637 c	6.375 b
C.V.(%)	9,24	9,37

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, para cada genótipo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Conclusões

Novas estirpes de *Bradyrhizobium elkanii* permitem que as linhagens de soja PELBR10-6000 RR e PELBR10-6049 RR expressem elevadas produtividades de grãos, decorrentes da eficiência do processo de fixação do N₂.

As estirpes de *B. elkanii* CMM 382, CMM 383, CMM 384 e CMM 385 apresentam desempenho superior com PELBR10-6000 RR e PELBR10-6049 RR, no processo de fixação biológica de nitrogênio nas terras baixas.

Agradecimentos

Aos técnicos Francisco Tomé Leite da Silva, Ieda Baade dos Santos e Liane Aldrighi Galarz, aos assistentes Claudinei Bonemann Rosso e Elton Rogério Nolasco Fonseca, da Embrapa Clima Temperado, à estagiária Thainá Madruga Nogueira, da Escola Técnica Estadual Santa Isabel, Pelotas, RS, pelo apoio na condução deste trabalho. Grupo apoiado pelo INCT “Microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas Visando à Sustentabilidade Agrícola e à Responsabilidade Ambiental” (MPCPAgro) (CNPq 465133/2014-4, Fundação Araucária – STI 043/2019, Capes).

Referências

- CAMPOS, B. C.; HUNGRIA, M.; TEDESCO, V. Eficiência da fixação biológica de N_2 por estirpes de *Bradyrhizobium* na soja em plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, p. 583-592, 2001.
- COCCO, K. L. T.; MATTOS, M. L. T.; OLIVEIRA, A. C. B. de; ALMEIDA, I. R. de; GALARZ, L. A.; SANTOS, I. M. dos; NOGUEIRA, T. N. Influência da disponibilidade hídrica na qualidade comercial de grãos de linhagens de soja em terras baixas. In: REUNIÃO DE PESQUISA DA SOJA DA REGIÃO SUL, 42., 2018, Três de Maio. **Atas e Resumos**. Três de Maio: Sociedade Educacional Três de Maio, 2018.
- DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; ARAÚJO, J. L. S.; ROWS, L. F. M.; ZILLI, J. E.; PARMA, M. M.; MELO, I. S.; HUNGRIA, M. *Bradyrhizobium stylosanthis* sp. nov., comprising nitrogen-fixing symbionts isolated from nodules of the tropical forage legume *Stylosanthes* spp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3078-3087, 2016.
- DUODU, S.; BHUVANESWARI, T. V.; STOKKERMANS, T. J. W.; PETERS, N. K. A positive role for rhizobitoxine in rhizobium-legume symbiosis. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 12, p. 1082-1089, 1999.
- HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1994. 542 p. (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 46).
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica de nitrogênio para a cultura da soja**: Componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80 p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).
- IRGA (Instituto Rio Grandense do Arroz). **Evolução da semeadura 2018/19**. Disponível em: <https://irga.rs.gov.br/safras-2> Acesso em: 20 ago. 2019.
- JAMES, E.; CRAWFORD, R. Effect of oxygen availability on nitrogen fixation by two *Lotus* species under flooded conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. 320, p. 599-609, March 1998.
- MALDANER, E. T.; MATTOS, M. L. T.; OLIVEIRA, A. C. B. de. Nodulação da cultivar de soja BRS 246 RR tratada com diferentes inoculantes comerciais em terras baixas. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, 5., 2014, Pelotas. **Qual o papel da ciência na agricultura familiar?**: anais... Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2015. 120 p.
- MATTOS, M. L. T.; OLIVEIRA, A. C. B. de. Efetividade de estirpes de *Bradyrhizobium* na nodulação da soja cultivada em terras baixas. In: REUNIÃO DE PESQUISA DA SOJA DA REGIÃO SUL, 40., Pelotas, 2014. **Atas e Resumos**... Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2014. 473 p.
- MATTOS, M. L. T.; OLIVEIRA, A. C. B. de; SCIVITTARO, W. B.; GALARZ, L. A.; MALDANER, E. T. Nodulação e rendimento de soja sob estresse hídrico no agrossistema Terras Baixas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 9., 2015, Pelotas. **Ciência e tecnologia para otimização da orizicultura**: anais... Brasília, DF: Embrapa; Pelotas: Sosbai, 2015.
- OLIVEIRA, A. C. B. (Ed.). **Cultivo de soja e milho em terras baixas do Rio Grande do Sul**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2017. p. 127-140.
- OLDROYD, G. E. D.; ENGSTROM, E. M.; LONG, S. R. Ethylene inhibits the nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. **Plant Cell**, v. 13, n. 8, p. 1835-1850, Aug. 2001. doi: 10.1105/TPC.010193
- ROSA, F. K. da; CARLI, R. de; HAMMES, J.; OLIVEIRA, A. C. B. de; ROSA, A. P. S. A. da; EMYGDIO, B. M. Avaliação de linhagens de soja em área de rotação com a cultura do arroz irrigado - Capão do Leão/RS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 7., 2013, Uberlândia. **Variedade melhorada: a força da nossa agricultura**: anais... Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2013. p. 845-847.
- SCHOLLES, D.; VARGAS, L. K. Viabilidade da inoculação de soja com estirpes de *Bradyrhizobium* em solo inundado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, n. 6, p. 973-979, Dec. 2004. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832004000600005&lng=en&nrm=iso. Acesso: 07 Oct. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832004000600005>.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO. **Manual de calagem e adubação para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. [s. l.]: Comissão de Química e Fertilidade do Solo - RS/SC, 2016. 376 p.
- VERNETTI JUNIOR, F. de J.; SCHUCH, L. O. B.; LUDWIG, M. **Tolerância ao encharcamento em genótipos de soja**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2012. 26 p. (Embrapa Clima Temperado. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 172).
- ZILLI, J. E.; PEREIRA, G. M. D.; FRANÇA JÚNIOR, I.; SILVA, K. da; HUNGRIA, M.; ROUWS, J. R. C. Dinâmica de rizóbios em solo do cerrado de Roraima durante o período de estiagem. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 43, n. 2, p. 153-160, 2013.

